

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
17 de Octubre de 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/081496 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU02/00003

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de Abril de 2002 (08.04.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
84/2001 6 de Abril de 2001 (06.04.2001) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
[CU/CU]; Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, Ciudad
Habana 12100 (CU).

(71) Solicitantes e

(72) Inventores: MATEO DE ACOSTA DEL RÍO, Cristina,
María [CU/CU]; Calle C # 9510 entre 6 y 10, Alta-
habana, Boyeros, Ciudad de la Habana 10800 (CU).
LOMBARDERO VALLADARES, Josefa [CU/CU];
Agustina # 70 entre San Miguel y Lagueruela, La Víbora,
10 de Octubre, Ciudad de la Habana 10500 (CU). ROQUE
NAVARRO, Lourdes, Tatiana [CU/CU]; Calle 13 # 4211
entre 42 y 44, Playa, Ciudad de la Habana 11300 (CU).

LÓPEZ REQUENA, Alejandro [CU/CU]; Avenida
de Acosta # 210 (bajos) entre Juan Bruno Zayas y Luz
Caballero,, La Víbora, 10 de Octubre, Ciudad de la Habana
10500 (CU).

(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga, Lidia; Ave
1ra # 1001, Esq. 10, Miramar, Playa, Ciudad de la Habana
11300 (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH,
GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nue-
vamente cuando se reciba dicho informe

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: GANGLIOSIDE-ASSOCIATED RECOMBINANT ANTIBODIES AND THE USE THEREOF IN THE DIAGNOSIS
AND TREATMENT OF TUMOURS

(54) Título: ANTICUERPOS RECOMBINANTES ASOCIADOS A GANGLIÓSIDOS. SU USO EN EL DIAGNÓSTICO Y TRA-
TAMIENTO DE TUMORES

(57) Abstract: The invention relates to the obtention of genetically-engineered antibodies from the P3 (AcM P3) murine monoclonal
antibody, which is produced by the hybridoma deposited under number ECACC 94113026 in accordance with the Budapest treaty,
and from the 1E10 (AcMai 1E10) anti-idiotypic thereof, which is produced by hybridoma ECACC 97112901, with the purpose of
obtaining antibodies which have the same recognition properties as the originals but which are less immunogenic. The chimaeric
antibodies contain the variable domains of murine immunoglobulin and the constant regions of human immunoglobulin. The human-
ised antibodies, in addition to containing the constant regions of human immunoglobulin, are modified in the murine frameworks
(FRs) region and, in particular, in those areas that can be converted into a T-cell antigenic site, as a result of which some FRS posi-
tions are human. Said antibodies can be used for the diagnosis and therapy of different types of tumours.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con la obtención de anticuerpos modificados por ingeniería genética a partir del
anticuerpo monoclonal murino P3 (AcM P3), producido por el hibridoma depositado según el tratado de Budapest bajo el número
ECACC 94113026 y de su anti-idiotipo 1E10 (AcMai 1E10) producido por el hibridoma ECACC 97112901, con el objetivo de lograr
anticuerpos con las mismas propiedades de reconocimiento de los originales pero que sean menos inmunogénicos que éstos. Los
anticuerpos quiméricos, contienen los dominios variables de la inmunoglobulina murina y las regiones constantes de la inmunoglo-
bulina humana; y los humanizados, además de contener las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, son modificados en
la región de los marcos (FRs) murinos y en particular en aquellas zonas que pudieran resultar en un sitio antigénico para las células
T, por lo que algunas posiciones de los FRS son humanas. Estos anticuerpos pueden ser utilizados en el diagnóstico y la terapia de
diferentes tipos de tumores.

WO 02/081496 A2



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

ANTICUERPOS RECOMBINANTES ASOCIADOS A GANGLIOSIDOS. SU USO EN EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES.

Sector Técnico.

- 5 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología, en particular con nuevos anticuerpos recombinantes obtenidos mediante el empleo de la ingeniería genética, específicamente con los anticuerpos quimérico y humanizado obtenidos a partir de los anticuerpos monoclonales murinos P3 (AcM P3) y su anti-idiotipo 1E10 (AcM 1E10).

- 10 Mas específicamente, la invención se relaciona con anticuerpos que se enlazan específicamente a gangliósidos portadores de ácido siálico *N*-glicosilado, pero no con las formas acetiladas de los gangliósidos ni con glicolípidos neutros, antígenos expresados en tumores de mama y melanoma. Además se ha demostrado el efecto anti-tumoral del AcM 1E10 en modelos experimentales.

- La presente invención también se relaciona con las composiciones farmacéuticas que
15 contienen los anticuerpos monoclonales recombinantes útiles en el diagnóstico y terapéutica del cáncer de mama y melanomas, previamente descritos.

Técnica anterior.

- Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico y que están presentes en las membranas plasmáticas de vertebrados (Stults y colaboradores (1989):
20 Glycosphingolipids: structure, biological source and properties, Methods Enzymology, 179:167-214). Algunas de estas moléculas han sido reportadas en la literatura como antígenos asociados a tumores o marcadores tumorales (Hakomori y colaboradores (1991): Possible functions of tumor associated carbohydrate antigens, Curr. Opin. Immunol., 3: 646-653), por lo que se ha descrito el uso de anticuerpos anti-gangliósidos como útiles en el
25 diagnóstico y terapéutica del cáncer (Houghton y colaboradores (1985): Mouse monoclonal antibody IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma, PNAS USA, 82:1242-1246; Zhang y colaboradores (1997): Selection of carbohydrate tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry. I. Focus on gangliosides, Int. J. Cancer, 73: 42-49).
- 30 Los ácidos siálicos más comúnmente encontrados en animales son el *N*-acetil (NeuAc) y el *N*-glicosil (NeuGc) (Corfield y colaboradores (1982): Occurrence of sialic acids, Cell. Biol. Monogr., 10: 5-50). En general el NeuGc no está expresado en tejidos normales de humanos y pollos, pero está ampliamente distribuido en otros vertebrados (Leeden y Yu (1976): Chemistry and analysis of sialic acid. In: Biological Role of Sialic Acid. Rosenberg A and Shengtrund CL (Eds). Plenum Press, New York, 1-48; Kawai y colaboradores (1991):
35 Quantitative determination of *N*-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous

tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry, *Cancer Research*, 51: 1242-1246). Sin embargo, hay reportes de la literatura que muestran que anticuerpos anti-NeuGc, reconocen algunos tumores humanos y líneas de células tumorales (Higashi y colaboradores (1988): Detection of gangliosides as *N*-glycolylneuraminic acid specific tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human retinoblastoma cells, *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 952-956; Fukui y colaboradores (1989): Detection of glycoproteins as tumor associated Hanganutziu-Deicher antigen in human gastric cancer cell line, NUGC4, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 1149-1154). Se ha encontrado además, un incremento de los niveles del gangliósido GM3 (NeuGc), en cáncer de mama humano (Marquina y colaboradores (1996): Gangliosides expressed in human breast cancer, *Cancer Research*, 1996; 56: 5165-5171), hallazgo que hace francamente atractivo el uso de esta molécula como blanco para la terapia de este tipo de cáncer.

El anticuerpo monoclonal (AcM) P3 es un anticuerpo murino de isotipo IgM, que se obtuvo al fundir esplenocitos de un ratón BALB/c inmunizado con liposomas que contenían GM3(NeuGc) y toxoide tetánico, con células de mieloma murino de la línea P3-X63-Ag8.653. (Línea celular depositada con el número de acceso ECACC 94113026, Patente Europea EP 0 657 471 B1).

Este AcM reacciona fuertemente con gangliósidos portadores de ácido siálico *N*-glicosilado, pero no con las formas acetiladas de los gangliósidos, ni con los glicolípidos neutros. En estudios inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos, llevados a cabo con líneas celulares, así como con cortes de tejidos de tumores benignos y neoplásicos, se demostró que el AcM P3 reconoce tumores de mama (Vázquez y colaboradores (1995): Generation of a murine monoclonal antibody specific for *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides that also recognizes sulfated glycolipids, *Hybridoma*, 14: 551-556) y melanoma.

El AcM P3 indujo una evidente respuesta anti-idiotípica (Ab2) en ratones BALB/c (modelo singénico), aún en ausencia de adyuvante y proteína transportadora, (Vázquez y colaboradores (1998): Syngeneic anti-Idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody, *Hybridoma*, 17: 527-534). Los estudios inmunológicos realizados sugieren el papel fundamental de los grupos electronegativos, en la forma de ácido siálico (en los gangliósidos) o de grupo SO₃⁻ (en los sulfátidos), en el reconocimiento de este anticuerpo (Moreno y colaboradores (1998): Delineation of epitope recognized by an antibody specific for *N*-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides, *Glycobiology*, 8: 695-705).

El AcM anti-idiotipo (AcMai) 1E10 de tipo IgG1, se obtuvo a partir de la Inmunización de ratones BALB/c con el AcM P3 acoplado a KLH (Patente norteamericana US 6,063,379,

línea celular depositada con el número de acceso ECACC 97112901). Al estudiar su especificidad de reconocimiento frente a un panel de AcMs anti-gangliósidos, reconoció solamente al P3 y no a otros AcMs anti-gangliósidos de isotipo IgM. Además, inhibió específicamente la unión del P3 al GM3(NeuGc) y a la línea de carcinoma ductal infiltrante de mama MDA-MB-435 (P3 positiva). El AcMai 1E10 indujo una fuerte respuesta de anticuerpos Ab3 en los modelos singénico y alogénico, dichos anticuerpos Ab3 no poseen la misma especificidad que el AcM P3, pero sí portan idiotopos de este AcM Ab1 (Vázquez y colaboradores (1998): Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody, Hybridoma, 17: 527-534). El AcMai 1E10 ejerce un fuerte efecto antitumoral en ratones singénicos y alogénicos. La vacunación de ratones BALB/c con dosis repetidas del AcMai 1E10 acoplado a KLH en adyuvante de Freund, redujo significativamente el crecimiento tumoral subcutáneo de la línea de carcinoma mamario F3II, y el número de metástasis pulmonares espontáneas. La administración por vía intravenosa del AcMai 1E10 en ratones C57BL/6, entre 10 y 14 días después de la inoculación intravenosa de células de melanoma B16, provocó una reducción dramática del número de metástasis pulmonares en comparación con ratones tratados con una IgG irrelevante. Los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren la activación de más de un mecanismo de respuesta antitumoral contra células de tumor mamario y melanoma (Vázquez y colaboradores (2000): Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides, Oncol. Rep., 7: 751-756, 2000).

Después de más de 15 años de desarrollada la tecnología de hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales murinos (Koehler y Milstein (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256: 495-497), los mismos han resultado muy útiles en el diagnóstico de enfermedades y en la investigación básica pero no han demostrado su eficacia terapéutica en humanos, lo que ha sido en gran medida debido a su corta vida media en sangre, así como al pobre reconocimiento de las funciones efectoras murinas por el sistema inmune humano, y además por la respuesta inmunológica que provoca el origen murino de los mismos al ser inyectados en pacientes (respuesta HAMA, siglas en inglés).

El desarrollo de la tecnología de ingeniería de genes ha revolucionado el potencial de los AcMs, ya que manipulando los genes de las inmunoglobulinas es posible hacer modificaciones en los anticuerpos con el objetivo de disminuir o eliminar la antigenicidad de los mismos, así como mejorar sus funciones efectoras cuando son usados en el tratamiento o diagnóstico de determinadas patologías. Estas manipulaciones tienen como objetivo esencial disminuir al máximo las diferencias en cuanto a propiedades inmunológicas entre el

- anticuerpo murino y una inmunoglobulina humana, sin alterar la especificidad por el antígeno (Morrison y Oi (1989): Genetically engineered antibody molecules, Adv Immunol., 44: 65-92). Recientemente se han desarrollado varios métodos para humanizar anticuerpos de ratón o de rata y así disminuir la respuesta xenogénica contra proteínas extrañas al ser los mismos
- 5 inyectados en humanos. Uno de los primeros intentos para reducir la antigenicidad ha sido generar anticuerpos "quiméricos", en los cuales los dominios variables de las proteínas murinas se insertan en dominios constantes de moléculas humanas, con lo cual no sólo se logra la disminución de la inmunogenicidad sino también el mejoramiento de funciones efectoras, ya que las mismas son humanas y por tanto reconocidas por el sistema inmune
- 10 (Morrison y colaboradores (1984): Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains, PNAS USA, 81: 6851-6855). Estas moléculas quiméricas mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno y su región constante no es inmunogénica, pero mantiene la inmunogenicidad contra la región variable murina.
- 15 Otros autores han logrado disminuir aún más la inmunogenicidad, insertando las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs) de los anticuerpos alogénicos sobre los marcos (FRs) de inmunoglobulinas humanas (Jones y colaboradores (1986): Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, Nature 321: 522-524; Verhoeyen y colaboradores (1988): Reshaping human antibodies: grafting an
- 20 antilysozyme activity, Science 239, 1534-1536). Sin embargo este método mostró diversos inconvenientes, fundamentalmente la pérdida de afinidad del anticuerpo en comparación con su contrapartida murina, por lo que fue necesario restaurar algunos de los residuos de los FRs por los correspondientes en la inmunoglobulina murina (Rietchmann y colaboradores (1988): Reshaping human antibodies for therapy, Nature, 332: 323-327;
- 25 Queen y colaboradores (1989): A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor, PNAS USA, 86: 10029-10033; Tempest y colaboradores (1991): Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection *in vivo*, Biotechnology, 9: 266-272). Además, en estos anticuerpos se observa frecuentemente inmunogenicidad.
- 30 Mateo y colaboradores (US Patent Number US 5 712 120) describen un procedimiento para la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos. Según el mismo, las modificaciones están restringidas a los dominios variables y específicamente a los FRs murinos de los anticuerpos quiméricos. Mas aún, las modificaciones se realizan solamente en aquellas regiones de los FRs que tienen una estructura de hélice anfipática y que por
- 35 tanto son potenciales epítomos reconocidos por las células T. El método propone sustituir los residuos de amino ácidos murinos dentro de las regiones anfipáticas por los

aminoácidos que se encuentren en la misma posición en las inmunoglobulinas humanas, quedando excluidos de estos cambios aquellos residuos que están involucrados en la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno, es decir la zona de Vernier, las estructuras canónicas de los CDRs y los aminoácidos en la interfase entre las

5 cadenas pesada y ligera.

El anticuerpo modificado por el método descrito por Mateo y colaboradores (Mateo y colaboradores (2000): Removal of T cell epitopes from genetically engineered antibodies: Production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity, Hybridoma 19: 463-71), retiene la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno del anticuerpo original y resulta

10 menos inmunogénico, lo cual incrementa su utilidad terapéutica. Mediante este procedimiento se logra, con un pequeño número de mutaciones, obtener anticuerpos modificados que muestran una reducción de la inmunogenicidad al ser comparados con el anticuerpo quimérico.

Descripción Detallada de la Invención

15 La presente invención se relaciona con anticuerpos recombinantes, obtenidos por técnicas de ingeniería genética. Específicamente la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal murino P3 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 94113026 que reconoce a un antígeno expresado en células de tumores de mama y melanomas, caracterizado porque las secuencias de las regiones

20 hipervariables (CDRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA

CDR1: RYSVH

CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS

25 CDR3: SGVREGRAQAWFAY

CADENA LIGERA

CDR1: KASQDVSTAVA

CDR2: SASYRYT

CDR3: QQHYSTPWT

30 Preferiblemente, las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA

FR1: QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSL

FR2: WVRQPPGKGLEWLG

35 FR3: RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYYCAR

FR4: WGQGT

CADENA LIGERA

FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

FR2: WYQQKPGQSPKLLIY

FR3: GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

5 FR4: FGGGTKL

Más preferible cuando el anticuerpo quimérico de la presente invención, contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana.

En una representación preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal murino P3 producido por el hibridoma con
10 número de depósito ECACC 94113026, caracterizado porque contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana y en la región de los marcos de la cadena ligera contiene al menos una de las siguientes mutaciones:

15 **CADENA LIGERA:**

Posición 8: His por Pro

Posición 9: Lys por Ser

Posición 10: Phe por Ser

Posición 11: Met por Leu

20 Posición 13: Thr por Ala

En otro aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal murino 1E10 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 97112901 que reconoce al AcM murino P3, caracterizado porque las secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran

25 a continuación:

CADENA PESADA

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG

CDR3: EDYYDNSYYFDY

30 **CADENA LIGERA**

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

Preferiblemente, las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada
35 y ligera de dicho anticuerpo son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

5 FR4: WGQGTTLTV

CADENA LIGERA

FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC

FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

10 FR4: FGGGTKLESK

Más preferible es cuando el anticuerpo quimérico de la presente invención, contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana.

En una representación preferida, la presente invención se relaciona con un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal murino 1E10 producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 97112901, caracterizado porque contiene la región constante de cadena pesada IgG1 humana y la región constante de cadena ligera Ck humana y en las regiones de los marcos de las cadenas pesada y ligera contiene al menos una de las siguientes mutaciones:

20 **CADENA LIGERA:**

Posición 7: Thr por Ser

Posición 8: Thr por Pro

Posición 15: Leu por Val

CADENA PESADA

25 Posición 5: Gln por Val

Posición 40: Arg por Ala

Posición 42: Glu por Gly

Posición 87 (83 según la numeración de Kabat): Thr por Arg

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con las líneas celulares que expresan los anticuerpos quiméricos y humanizados descritos en la misma, así como con composiciones farmacéuticas caracterizadas porque contienen uno de los anticuerpos descritos.

La invención por tanto se relaciona con composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores malignos de mama, pulmón, sistema digestivo, sistema urogenital, melanomas, sarcomas y tumores de origen neuroectodérmico, sus metástasis y recidivas, caracterizadas

porque contienen uno de los anticuerpos monoclonales descritos y un excipiente apropiado para su aplicación.

En otra representación de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden usar para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos de mama, pulmón, sistema digestivo, sistema urogenital, melanomas, sarcomas y tumores de origen neuroectodérmico, sus metástasis y recidivas.

Síntesis de cDNA y amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las regiones variables del anticuerpo murino P3 y 1E10.

El ARN fue obtenido de 10^6 células de hibridoma del P3 (AcM murino, IgM, que reconoce a los gangliósidos GM3 N-glicosilados) o del hibridoma del 1E10 (que reconoce al P3). El método usado para la extracción del ARN fue usando el reactivo TRIZOL (GIBCO BRL, Grand Island, NY), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó en una reacción con 5 µg del ARN obtenido con 25 pmoles del oligo diseñado para hibridar con el principio de la región constante de las IgM murinas para el caso de la VHP3, y con el principio de la región constante de la IgG1 murina para el caso de la VH 1E10, y para la región variable de cadena ligera (VK), que hibride en región constante kappa murina para ambos anticuerpos, 2.5 mM de cada deoxinucleótido (dNTPs), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 8 mM MgCl₂ y 15 unidades de inhibidor de RNasa en un volumen total de 50 µl. Esta mezcla es calentada a 70°C, por 10 minutos y enfriada lentamente hasta 37°C. Al final se añaden 100 unidades de enzima transcriptasa reversa y se incuba a 42°C por una hora.

Las regiones variables VK y VH fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Brevemente, 5 µl de ADNc de VH o de VK se mezclan con 25 pmoles de primers específicos, 2.5 mM de cada dNTP, 5 µl de buffer 10X de Taq DNA polimerasa y 1 unidad de esta enzima. Las muestras fueron sometidas a 25 ciclos de PCR con temperaturas de 94°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C, 1 min, con una incubación final de 5 minutos a 72°C.

Clonaje y secuenciación del ADNc amplificado.

Los productos de las PCRs de VH y VK (del P3 y del 1E10) fueron clonados en el vector TA (TA Cloning kit. Promega, USA). Los clones resultantes fueron secuenciados por el método de los dideoxinucleótidos usando T7 ADN Polimerasa y el juego de reactivos de la casa comercial Pharmacia (T7 sequencing kit, Pharmacia, Sweden).

Construcción de genes quiméricos.

Los genes de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras fueron obtenidos por restricciones enzimáticas de las construcciones intermedias en el vector TA y clonados en los respectivos vectores de expresión (Coloma y colaboradores (1992): Novel vectors for the

expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, J. Immunol. Meth., 152: 89-104).

Los genes VH fueron cortados del vector TA por digestión enzimática con EcoRV y NheI y clonados en un vector de expresión (PAH 4604), que tiene incluida una región variable IgG1 humana y como marcador de selección el gen de resistencia al histidinol. La construcción resultante es el P3VH-PAH4604 o el 1E10VH-PAH4604. Los genes VK fueron cortados del vector TA por digestión con las enzimas EcoRV y Sall, para ser clonados en el vector PAG4622. Este vector tiene un gen de resistencia al ácido micofenólico y la región constante kappa humana incluida. La construcción genética resultante es el P3VK-PAG4622 o el 1E10VK-PAG4622.

Expresión del anticuerpo quimérico del P3 y del 1E10.

Células NS-0 fueron electroporadas con 10 µg de P3VK-PAG4622 o 1E10VK-PAG4622, y luego de obtenido el clon productor de cadena ligera kappa humana, este fue transfectado con 10 µg de P3VH-PAH4604 o 1E10VH-PAH4604, linealizados con enzima PvuI en ambos casos. Los ADNs precipitados con etanol fueron disueltos en 50 µl de PBS. Aproximadamente 10^7 células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml de PBS junto con el ADN en una cubeta de electroporación. Después de 10 minutos en hielo las células fueron sometidas a un pulso de 200 volts y 960 µFaradios y dejadas en hielo por 10 minutos. Las células se cultivan placas de 96 pocillos con medio suplementado con suero fetal de ternera al 10%. A los dos y cuatro días se añade medio selectivo (D'MEM F12 con ácido micofenólico 0,45 µg/mL o histidinol 10mM, respectivamente). Los clones transfectados se hicieron visibles a los 10 días de añadido el medio selectivo.

La presencia del anticuerpo humano en las placas fue detectada por ELISA. Las placas fueron recubiertas con un anticuerpo obtenido en chiva que reconoce específicamente cadena gamma humana, los pozos fueron lavados con PBS-T (solución salina tamponada de fosfato que contiene 0.05% de Tween 20), sobrenadante diluido del medio de cultivo fueron añadidos a cada pozo de las placas de ELISA y dejados una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se le añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena kappa humana y que está conjugado con peroxidasa de rábano picante (para el clon productor de cadena kappa humana) o un anticuerpo de chiva que reconoce cadena gamma humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina (para el clon productor del anticuerpo completo), y se dejó a temperatura ambiente por una hora. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato o-fenilendiamina más peróxido de hidrógeno o dietanolamina, respectivamente. Después de media hora, la absorbancia fue medida a 492 o 405 nm, respectivamente.

Construcción del anticuerpo humanizado P3hu y 1E10hu por humanización de epítomos T. Predicción de epítomos T.

Las secuencias de los dominios variables del P3 y del 1E10 fueron analizadas con el Programa AMPHI (Margalit y colaboradores (1987): Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence, J. Immunol., 138: 2213-2229), el cual permite la identificación de segmentos de 7 ó de 11 aminoácidos con una estructura de hélice anfipática, a la cual se ha relacionado la inmunogenicidad T. Además se usó el programa SOHHA que predice también zonas de hélices hidrofóbicas. (Elliot y colaboradores (1987) An hypothesis on the binding of an amphipatic, alfa helical sequence in II to the desotope of class II antigen, J. Immunol., 138: 2949-2952). Estos algoritmos permitieron predecir en las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales murinos P3 y 1E10, fragmentos relacionados con la presentación de epítomos T al complejo de moléculas MHC II.

Análisis de Homología con inmunoglobulinas humanas.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del P3 y 1E10, fueron comparadas con las secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas reportadas, para identificar la inmunoglobulina humana de mayor homología con la molécula murina sometida a análisis.

Las bases de secuencias humanas utilizadas fueron las reportadas en GeneBank y EMBL, ambas bases de datos se encuentran disponibles en Internet. Para la búsqueda de homología se usó el programa PC-TWO HIBIO PROSIS 06-00, Hitachi.

Análisis para la reducción de inmunogenicidad.

La esencia del método radica en lograr una reducción de la inmunogenicidad por la humanización de los posibles epítomos T, esto con un mínimo de mutaciones en los FRs, específicamente en aquellos segmentos que tienen una estructura de hélice anfipática, quedando excluidas aquellas posiciones involucradas con las estructuras canónicas, la zona de vernier o el sitio de reconocimiento del antígeno.

Según el método, se compararon las secuencias de las regiones variables de VH y VL de la inmunoglobulina murina con la humana más homóloga y se identificaron los residuos que difieren entre la secuencia murina y la secuencia humana, sólo en los segmentos anfipáticos que quedan dentro de la región de los marcos o "frameworks" (FRs) (Kabat (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health), estos residuos "murinos" fueron los susceptibles de ser mutados por aquellos que se encuentran en la misma posición en la secuencia humana. Las sustituciones se hicieron por las técnicas convencionales de mutagénesis dirigida.

Los residuos que se encuentran en las posiciones de los FRs responsables de las estructuras canónicas o en la zona de Vernier, no pueden ser mutados, porque pudieran afectar la estructura tridimensional del dominio variable del anticuerpo y por tanto afectar su unión al antígeno. Información adicional sobre la influencia de las sustituciones que se hacen en la estructura terciaria, pueden ser obtenidas por modelaje molecular de las regiones variables.

Dado que en el análisis de las mutaciones pueden tenerse en cuenta elementos tales como la presencia de residuos prolina en la hélice anfipática, o el hecho de que un determinado residuo murino no aparezca en la misma posición en la secuencia humana más homóloga pero sea frecuente en otras inmunoglobulinas humanas, es posible obtener una versión que contenga un máximo de mutaciones, es decir, donde se muten todos los residuos murinos, pero pueden obtenerse otras versiones con diferentes combinaciones de mutaciones.

Las mutaciones se realizan por sobrelapamientos de PCRs.

Clonaje y expresión del anticuerpo humanizado P3hu y 1E10hu

Una vez obtenidas las construcciones genéticas correspondientes al P3hu o al 1E10hu, por el método descrito anteriormente, estas fueron clonadas en los vectores de expresión, de manera similar a la descrita anteriormente en el caso de la construcción del anticuerpo quimérico, obteniéndose las construcciones genéticas siguientes: P3VKhu-PAG4622 o 1E10VKhu-PAG4622 y P3VHhu-PAH4604 y 1E10VHhu-PAH4604. La transfección de estos genes a las células NS-0 fue exactamente con las mismas condiciones que las descritas anteriormente en el caso del anticuerpo quimérico.

Purificación de los anticuerpos recombinantes.

Los anticuerpos recombinantes fueron purificados por cromatografía de afinidad con proteína A (Pharmacia, Upssala, Sweden).

Actividad biológica.

La actividad biológica de los anticuerpos recombinantes fue ensayada por su unión a los respectivos antígenos en placas de ELISA. Para las variantes del anticuerpo P3, las placas fueron recubiertas con el gangliósido GM3(NeuGc), se lavaron con tampón Tris-HCl, y se bloquearon para eliminar las uniones inespecíficas con Tris-HCl con albúmina de suero bovina (BSA) al 1%, incubándose a 37°C una hora. Al cabo de ese tiempo se volvieron a lavar y se les añadió el anticuerpo P3 recombinante purificado, incubando otra hora. Luego después de lavadas se les añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena gamma humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina, y se incubó una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con Tris-HCl y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato dietanolamina. Después de media hora la absorbancia fue medida a 405 ó 492 nm. Para las versiones recombinantes del 1E10, se realizó un ensayo similar, pero recubriendo

las placas de ELISA con AcM murino P3 y lavando las placas con PBS-T (solución salina tamponada de fosfato que contiene 0.05% de Tween 20).

Ejemplos de Realización.

- En los siguientes ejemplos todas las enzimas de restricción o modificación utilizadas, así como reactivos y materiales fueron obtenidos de fuentes comerciales a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Quimérico P3.

- El ADNc del AcM P3 se obtiene por la reacción de la enzima transcriptasa reversa a partir del ARN extraído del hibridoma productor de dicho anticuerpo, según se explica en la descripción detallada de la invención. La secuencia de los cebadores específicos utilizados en esta reacción se muestran a continuación

Para VH:

5' AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC 3'

Para VK:

- 5' GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG 3'

El ADNc de las cadenas VHP3 y VKP3 fueron amplificadas por PCR con la enzima Taq polimerasa y utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción ECORV /NHEI, para VH y ECORV/SALI para VK. Los oligonucleótidos específicos usados como cebadores de esta reacción fueron:

- Para VH:**

Oligonucleótido 1 (hibrida por el péptido señal):

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Oligonucleótido 2 (hibrida por el CH1):

5' GGGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT 3'

- Para VK:**

Oligonucleótido1 (hibrida por el péptido señal):

5' GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)T 3'

Oligonucleótido 2 (hibrida por Ck):

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

- El producto de la PCR fue clonado en el vector TA (TA cloning kit, Invitrogen). Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). Las secuencias de VHP3 y VKP3 (Figuras 1 y 2) tienen alta relación con el subgrupo IB y V, respectivamente según la clasificación de Kabat.

- Posteriormente, la cadena VHP3 fue digerida con las enzimas ECORV y NHEI y la VKP3 con ECORV y SALI, y clonadas en los vectores previamente digeridos con las mismas enzimas PAH4604 y PAG4622, para VH y VK respectivamente. Estos vectores fueron

donados por Sherie Morrison (UCLA, California, USA). Los mismos son usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores. El vector PAH 4604 tiene incluida la región constante humana IgG1 y el PAG 4622 humana Ck (Coloma y colaboradores (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, J. Immunol. Meth., 152: 89-104) Una vez clonadas la regiones VH y VK del P3 en los vectores anteriores, se formaron las construcciones VHP3-PAH4604 y VKP3-PAG4622.

Células NS-0 fueron electroporadas con 10 µg de P3VK-PAG4622, y luego de obtenido el clon productor de cadena ligera kappa humana, este fue transfectado con 10 µg de P3VH-PAH4604, linealizados con enzima PvuI en ambos casos. Los ADNs precipitados con etanol fueron disueltos en 50 µl de PBS. Aproximadamente 10^7 células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml de PBS junto con el ADN en una cubeta de electroporación. Después de 10 minutos en hielo las células fueron sometidas a un pulso de 200 voltios y 960 µFaradios y dejadas en hielo por 10 minutos. Las células se cultivan placas de 96 pocillos con suplementado con suero fetal de ternera al 10%. A los dos y cuatro días se añade medio selectivo (D'MEM F12 con ácido micofenólico 0,45 µg/mL o histidinol 10mM, respectivamente). Los clones transfectados se hicieron visibles a los 10 días de añadido el medio selectivo.

La presencia del anticuerpo humano en las placas fue detectada por ELISA. Las placas fueron recubiertas con un anticuerpo obtenido en chiva que reconoce específicamente cadena gamma humana, los pozos fueron lavados con PBS-T (solución salina tamponada de fosfato que contiene 0.05% de Tween 20), sobrenadante diluido del medio de cultivo fue añadido a cada pozo de las placas de ELISA y dejado una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se le añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena kappa humana y que está conjugado con peroxidasa de rábano picante (para el clon productor de cadena kappa humana) o un anticuerpo de chiva que reconoce cadena gamma humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina (para el clon productor del anticuerpo completo), y se dejó a temperatura ambiente por una hora. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato o-fenilendiamina más peróxido de hidrógeno o dietanolamina, respectivamente. Después de media hora la absorbancia fue medida a 492 o 405 nm, respectivamente.

Ejemplo 2. Obtención de diferentes versiones del Anticuerpo Humanizado P3.

Las secuencia de VHP3 y VKP3 (Figuras 1 y 2) fueron comparadas con una base de datos de secuencias humanas, obteniéndose la secuencia humana de mayor homología con el anticuerpo P3 (Figuras 3 y 4). Posteriormente en ambas secuencias (VH y VK) se determinaron las regiones anfipáticas o posibles epitopos T. Se determinaron las

mutaciones a realizar para romper o humanizar los potenciales epitopos T dentro de dichas secuencias.

En el caso de la región VHP3 no se introdujeron mutaciones. Como se muestra en la figura 3, se encontraron 2 segmentos anfipáticos. Los mismos incluyen el CDR1, FR2 y parte del CDR2, así como el final del FR3 y el CDR3 completo. No se proponen mutaciones porque las diferencias entre la secuencia murina VHP3 y la humana de mas homología sólo se encuentran en los CDRs, que no se pueden cambiar o involucran aminoácidos de la zona de Vernier o son posiciones claves en el reconocimiento del antígeno.

Para la cadena VK, se encontraron 2 fragmentos anfipáticos, un primer bloque en el FR1 y un segundo bloque que abarca el CDR2 y parte del FR3. Se proponen cambiar los aminoácidos de las posiciones 8,9,10,11y13. En estas posiciones se encuentran los aminoácidos His, Lys, Phe, Met y Thr, que se sustituyen por Pro, Ser, Ser, Leu, y Ala, respectivamente. Estas mutaciones se realizaron por sobrelapamientos de PCRs usando los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4 (Kammann y colaboradores (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), Nucleic Acids Res., 17: 5404).

A continuación se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Esta construcción genética se le nombró P3VKhu.

Oligonucleótidos para las mutaciones 8,9,10,11 y 13, de la cadena ligera.

Oligo 1:

5' ATGACCCAGTCTCCTTCTTCTCTTTCCGCGTCAGTAGGAGAC 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

5' GTCTCCTACTGACGCGGAAAGAGAAGAAGGAGACTGGGTCAT 3'

Oligo 4:

5'GGGGATATCCACCATGGAG(TA)CACA(GT)(TA)CTCAGGTCTTT(GA)T 3'

Una vez realizadas las mutaciones, estas fueron verificadas por secuencia.

Las cadenas VH quimérica y VK humanizadas fueron clonadas en los vectores PAG 4622 y PAH4604, formando las construcciones P3VH-PAH4604 y P3VKhu-PAG4622, respectivamente.

El proceso de electroporación y detección de los clones que expresaban el anticuerpo humanizado P3h fue idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico.

Ejemplo 3: Actividad Biológica del Anticuerpo Quimérico P3.

La actividad biológica del anticuerpo quimérico fue ensayada por su unión al antígeno mediante la técnica de ELISA. Para el anticuerpo quimérico P3, las placas fueron recubiertas con el gangliósido GM3(NeuGc), se lavaron con tampón Tris-HCl, y se

bloquearon para eliminar las uniones inespecíficas con Tris-HCl con albúmina de suero bovina (BSA) al 1%, incubándose a 37°C una hora. Al cabo de ese tiempo se volvieron a lavar y se les añadió el anticuerpo P3 quimérico purificado, incubándose otra hora. Luego después de lavadas se les añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena gamma humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina, y se incubó una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con Tris-HCl y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato dietanolamina. Después de media hora la absorbancia fue medida a 405 nm.

El anticuerpo T1 se usó en este ensayo como control negativo.

En la Figura 5 se muestra la unión específica del anticuerpo quimérico P3 al antígeno..

10 Ejemplo 4. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Quimérico 1E10.

Las cadenas VH1E10 y VK1E10 fueron amplificadas por (PCR) con la enzima Taq polimerasa y utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción ECORV /NHEI, para VH y ECORV/SALI para VK. Los oligonucleótidos específicos usados como cebadores fueron:

15 Para VH:

5'GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Para VK:

5'GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGGA 3'

El ADNc de las cadenas VH1E10 y VK1E10 fue amplificado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los oligonucleótidos específicos usados como cebadores en esta reacción de amplificación fueron:

Para VH:

Oligonucleótido 1 (hibrida por el péptido señal):

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

25 Oligonucleótido 2 (hibrida por el CH1):

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Para VK:

Oligonucleótido1 (hibrida por el péptido señal):

5'GGGGTTAACCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)GCTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GG(GA)3'

30 Oligonucleótido 2 (hibrida por el Ck):

5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC3'

El producto de la PCR fue clonado en el vector TA (TA cloning kit de la Invitrogen). Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). Las secuencias de VH1E10 y VK1E10 tienen alta relación con el subgrupo misceláneas y V, respectivamente, según la clasificación de Kabat. (Figuras 6 y 7).

Posteriormente, la cadena VH1E10 fue digerida con las enzimas ECORV y NHEI y la VK1E10 con HincII y SALI, y clonadas en los vectores previamente digeridos con las enzimas apropiadas PAH4604 y PAG4622, para VH y VK respectivamente. Estos vectores fueron donados por Sherie Morrison (UCLA, California, USA). Los mismos son usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores. El vector PAH 4604 tiene incluida la región constante humana IgG1 y el PAG 4622 humana Ck (Coloma y colaboradores (1992): Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction, J. Immunol. Meth., 152: 89-104) Una vez clonadas la regiones VH y VK del 1E10 en los vectores anteriores, se formaron las construcciones VH1E10-PAH4604 y VK1E10-PAG4622.

Células NS-0 fueron electroporadas con 10 µg de P3VK-PAG4622 o 1E10VK-PAG4622, y luego de obtenido el clon productor de cadena ligera kappa humana, este fue transfectado con 10 µg de P3VH-PAH4604 o 1E10VH-PAH4604, linealizados con enzima PvuI en ambos casos. Los ADNs precipitados con etanol fueron disueltos en 50 µl de PBS. Aproximadamente 10⁷ células fueron colectadas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml de PBS junto con el ADN en una cubeta de electroporación. Después de 10 minutos en hielo las células fueron sometidas a un pulso de 200 volts y 960 µFaradios y dejadas en hielo por 10 minutos. Las células se cultivan placas de 96 pocillos con suplementado con suero fetal de ternera al 10%. A los dos y cuatro días se añade medio selectivo (D'MEM F12 con ácido micofenólico 0,45 µg/mL o histidinol 10mM, respectivamente). Los clones transfectados se hicieron visibles a los 10 días de añadido el medio selectivo.

La presencia del anticuerpo humano en las placas fue detectada por ELISA. Las placas fueron recubiertas con un anticuerpo obtenido en chiva que reconoce específicamente cadena gamma humana, los pozos fueron lavados con PBS-T (solución salina tamponada de fosfato que contiene 0.05% de Tween 20), sobrenadante diluido del medio de cultivo fueron añadidos a cada pozo de las placas de ELISA y dejados una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se le añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena kappa humana y que está conjugado con peroxidasa de rábano picante (para el clon productor de cadena kappa humana) o un anticuerpo de chiva que reconoce cadena gamma humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina (para el clon productor del anticuerpo completo), y se dejó a temperatura ambiente por una hora. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato o-fenilendiamina más peróxido de hidrógeno o dietanolamina, respectivamente. Después de media hora la absorbancia fue medida a 492 o 405 nm, respectivamente.

Ejemplo 5. Obtención de diferentes versiones del Anticuerpo Humanizado 1E10.

Las secuencia de VH1E10 y VK1E10 (Figuras 6 y 7) fueron comparadas con una base de datos de secuencias humanas, obteniéndose la secuencia humana de mayor homología con el anticuerpo 1E10 (Figuras 8 y 9). Posteriormente en ambas secuencias (VH y VK) se

5 determinaron las regiones anfipáticas o posibles epitopos T. Posteriormente se determinaron las mutaciones a realizar para convertir la secuencia de VH y VK murinas en humanizadas por este método. Señalamos a continuación el máximo de mutaciones posibles, que se pueden hacer.

Hay algunos de los aminoácidos señalados que forman parte de bloques anfipáticos donde

10 se incluyen Pro y Lys, (que se sabe que no deben formar parte de hélices anfipáticas, pues pueden ser falsos positivos). Esto mismo sucede en el análisis posterior que se hizo con la VK.

En el caso de la región VH se introdujeron mutaciones en las posiciones 5, que pertenece a un bloque anfipático que abarca la mayor parte del FR1, en las 40 y 42, de un bloque

15 anfipático que se encuentra en el FR2 y parte del CDR3, y en la posición 87 del bloque que abarca el FR3. Se sustituyeron los aminoácidos Gln, Arg, Glu y Thr por Val, Ala, Gly y Arg, respectivamente. Estas mutaciones se realizaron por sobrelapamientos de PCRs usando los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, en un primer PCR y después se sobrelapó el resultado de los mismos en otro PCR, usando solo los oligonucleótidos 2 y 4 cuyas secuencias se muestran

20 a continuación (Kammann y colaboradores (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR), Nucleic Acids Res., 17: 5404).

Oligonucleótidos para la mutación 5 de la cadena pesada.

Oligo 1:

5' CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCT 3'

25 Oligo 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Oligo 3:

5' AGCTCCAGACTGCACCAGCTGAACCTG 3'

Oligo 4:

30 5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Una vez secuenciada y verificada la anterior mutación a los DNAs que portaban la misma, se les introdujo las mutaciones correspondientes a las posiciones 40 y 42.

A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, descritos para esta mutación. El sobrelapamiento de los productos de los PCRs se hizo de la misma manera descrita

35 anteriormente. Las mutaciones fueron verificadas por secuencia.

Oligonucleótidos para las mutaciones 40 y 42 de la cadena pesada:

Oligo 1:

5' TGGGTGAGGCAGGCGCCTGGGCAGGGACTTGAG 3'

Oligo 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

5 Oligo 3:

5' CTAAGTCCCTGCCCAGGCGCCTGCCTCACCCA 3'

Oligo 4:

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

Una vez secuenciada y verificada las anteriores mutaciones a los ADNs que portaban las
10 mismas, se les introdujo la mutación correspondiente a la posición 87.

A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, descritos para esta mutación.
El solapamiento de los productos de los PCRs se hizo de la misma manera descrita
anteriormente. Las mutaciones fueron verificadas por secuencia.

Oligonucleótidos para la mutación 87 de la cadena pesada:

15 Oligo 1:

5' CTCAGCAGGCTGCGGTCTGAGGACTCT 3'

Oligo 2:

5' GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT 3'

Oligo 3:

20 5' AGAGTCCTCAGACCGCAGCCTGCTGAG 3'

Oligo 4:

5'GGGGATATCCACCATGG(AG)ATG(CG)AGCTG(TG)GT(CA)AT(CG)CTCTT 3'

A esta construcción final se le llama 1E10VHhu.

En el caso de la cadena pesada, hay aminoácidos diferentes entre la cadena VH1E10 y la
25 humana más parecida y sin embargo estos no fueron cambiados, porque estas
sustituciones involucran aminoácidos de la zona de Vernier o son posiciones claves en el
reconocimiento del antígeno.

Para la cadena VK, se realizaron mutaciones en las posiciones 7,8 y 15 sustituyendo Thr,
Thr y Leu por Ser, Pro y Val, respectivamente.

30 Las mutaciones fueron introducidas de la misma manera que en la cadena pesada, a
continuación se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Esta construcción
genética se le nombró 1E10VKhu.

Oligonucleótidos para las mutaciones 7,8 y 15 de la cadena ligera:

Oligo 1:

35 5'CAGATGACACAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACAGAGTC 3'

Oligo 2:

5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

5'GACTCTGTCTCCACAGAGGCAGACAGGGAGGAAGGAGACTGTGTCATCTG 3'

Oligo 4:

- 5 5'GGGGTTAACCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)GCTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GG(GA) 3'

Una vez realizadas las mutaciones, estas fueron verificadas por secuencia. A esta construcción resultante se le llamó 1E10VKhu.

Las cadenas VK y VH humanizadas fueron clonadas en los vectores PAG 4622 y PAH4604, formando las construcciones 1E10VHhu-PAH4604 y 1E10VKhu-PAG4622 respectivamente.

- 10 El proceso de electroporación y detección de los clones que expresaban el anticuerpo humanizado 1E10h fue idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico.

Ejemplo 6: Actividad Biológica del Anticuerpo Quimérico 1E10.

La actividad biológica del anticuerpo 1E10 quimérico fue ensayada por ELISA. Las placas fueron recubiertas con el AcM murino P3, se lavaron con PBS-T (solución salina tamponada de fosfato que contiene 0.05% de Tween 20), sobrenadante diluido del medio de cultivo fue
15 añadido a cada pozo de las placas de ELISA y se incubó una hora a 37°C. Luego después de lavadas se les añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena gamma humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina, y se incubó una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato
20 dietanolamina. Después de media hora la absorbancia fue medida a 405 nm. Los resultados se muestran en la Figura 10.

El AcM C5 quimérico se usó como control negativo

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducidas de la región variable de la
25 cadena pesada del anticuerpo P3. Los aminoácidos están numerados de acuerdo a Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health), y aparecen sobre el codón que los codifica. Los CDRs están señalados con líneas discontinuas.

- Figura 2: Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de la región variable de la
30 cadena ligera del anticuerpo P3. Los aminoácidos están numerados de acuerdo a Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health), y aparecen sobre el codón que los codifica. Los CDRs están señalados con líneas discontinuas.

Figura 3: Alineación de la secuencia aminoacídica de VHP3 con la humana más homóloga.

- 35 Los segmentos anfipáticos están subrayados y los CDRs en negritas cursivas.

Figura 4: Alineación de la secuencia aminoacídica de VKP3 con la humana más homóloga. Los segmentos anfipáticos están subrayados y los CDRs en negritas cursivas.

Figura 5: Reconocimiento específico del GM3(NeuGc) por el anticuerpo P3 quimérico. Se enfrentaron diferentes concentraciones de los anticuerpos quiméricos P3 y T1 (irrelevante) a
5 placas de ELISA recubiertas con GM3(NeuGc) y GM3(NeuAc), y se midió la unión específica.

Figura 6: Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de las región variable de la cadena pesada del anticuerpo 1E10. Los aminoácidos están numerados de acuerdo a Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores (1991), Sequences of proteins of immunological
10 interest, Fifth Edition, National Institute of Health), y aparecen sobre el codón que los codifica. Los CDRs están señalados con líneas discontinuas.

Figura 7: Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de las región variable de la cadena ligera del anticuerpo 1E10. Los aminoácidos están numerados de acuerdo a Kabat y colaboradores (Kabat y colaboradores (1991), Sequences of proteins of immunological
15 interest, Fifth Edition, National Institute of Health), y aparecen sobre el codón que los codifica. Los CDRs están señalados con líneas discontinuas.

Figura 8: Alineación de la secuencia aminoacídica de VH1E10 con la humana más homóloga. Los segmentos anfipáticos están subrayados y los CDRs en negritas cursivas.

Figura 9: Alineación de la secuencia aminoacídica de VK1E10 con la humana más
20 homóloga. Los segmentos anfipáticos están subrayados y los CDRs en negritas cursivas.

Figura 10: Reconocimiento específico del AcM murino P3 por el anticuerpo 1E10 quimérico. Se enfrentaron diferentes concentraciones de los anticuerpos quiméricos 1E10 y C5 (irrelevante) a placas de ELISA recubiertas con AcM P3 y AcM A3, y se midió la unión específica.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un anticuerpo monoclonal quimérico, derivado del anticuerpo monoclonal murino AcM P3 que reconoce gangliosidos N-glicolilados y que es producido por el hibridoma con número de depósito ECACC 94113026, caracterizado porque los dominios hipervariables de sus
- 5 cadenas pesada y ligera comprenden las siguientes secuencias:
- CADENA PESADA**
- CDR1: RYSVH
CDR2: MIWGGGSTDYNSALKS
CDR3: SGVREGRAQAWFAY
- 10 **CADENA LIGERA**
- CDR1: KASQDVSTAVA
CDR2: SASYRYT
CDR3: QQHYPSTPWT
- 15 2.- Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, caracterizado porque las regiones de los marcos (FRs) de sus cadenas pesada y ligera comprenden las siguientes secuencias:
- CADENA PESADA**
- FR1: QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSL
FR2: WVRQPPGKGLEWLG
FR3: RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR
FR4: WGQGTLV
- 20 **CADENA LIGERA**
- FR1: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
FR2: WYQQKPGQSPKLLIY
FR3: GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC
FR4: FGGGTKL
- 25
- 3.- Un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque para su humanización y preservación de su afinidad por el antígeno, incluye al menos una de las
- 30 siguientes sustituciones:
- CADENA LIGERA:**
- Posición 8: His por Pro
Posición 9: Lys por Ser
Posición 10: Phe por Ser
Posición 11: Met por Leu
Posición 13: Thr por Ala
- 35

4.- Un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizado porque la región constante de su cadena pesada comprende la secuencia de amino ácidos de la región constante de la cadena pesada gamma-1 y la región constante de su cadena ligera comprende la secuencia de amino ácidos de la región constante de la cadena capa, ambas
5 provenientes de inmunoglobulinas humanas.

5.- Una línea celular caracterizada porque produce cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 1 a la 4.

10 6.- Una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de mama y melanomas, sus metástasis y recidivas caracterizada porque comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 1 a la 4.

7.- Una composición farmacéutica para la localización e identificación "in vivo" de tumores
15 malignos de mama y melanomas, sus metástasis y recidivas caracterizada porque comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 1 a la 4.

8.- Uso del anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones de la 1 a la 4 para la fabricación
20 de un medicamento útil para el tratamiento de tumores malignos de mama y melanomas, sus metástasis y recidivas.

9.- Un anticuerpo monoclonal quimérico derivado del anticuerpo monoclonal antiidiotipo murino AcM 1E10 que reconoce al AcM murino P3 y que es producido por el hibridoma con
25 número de depósito ECACC 97112901, caracterizado porque los dominios hipervariables de sus cadenas pesada y ligera comprenden las siguientes secuencias:

CADENA PESADA

CDR1: SYDIN

CDR2: WIFPGDGSTKYNEKFKG

30 CDR3: EDYYDNSYYFDY

CADENA LIGERA

CDR1: RASQDISNYLN

CDR2: YTSRLHSG

CDR3: QQGNTLPWT

35

10.- Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 9, caracterizado porque las regiones de los marcos (FRs) de sus cadenas pesada y ligera comprenden las siguientes secuencias:

CADENA PESADA

FR1: QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT

5 FR2: WVRQRPEQGLEWIG

FR3: KATLTDDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCAR

FR4: WGQGTTLTV

CADENA LIGERA

FR1: DIQMTQTTSSLSASLGDRVITSC

10 FR2: WYQQKPDGTVKLLIY

FR3: VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

FR4: FGGGTKLESK

11.- Un anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 9 y 10, caracterizado porque para su humanización y preservación de su afinidad por el antígeno, incluye al menos una de las siguientes sustituciones:

CADENA LIGERA:

Posición 7: Thr por Ser

Posición 8: Thr por Pro

20 Posición 15: Leu por Val

CADENA PESADA

Posición 5: Gln por Val

Posición 40: Arg por Ala

Posición 42: Glu por Gly

25 Posición 87: Thr por Arg

12.- Un anticuerpo monoclonal según reivindicaciones de la 9 a la 11, caracterizado porque la región constante de su cadena pesada comprende la secuencia de amino ácidos de la región constante de la cadena pesada gamma-1 y la región constante de su cadena ligera comprende la secuencia de amino ácidos de la región constante de la cadena capa, ambas provenientes de inmunoglobulinas humanas.

13.- Una línea celular caracterizada porque produce cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 9 a la 12.

- 14.- Una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de mama y melanomas, sus metástasis y recidivas caracterizada porque comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 9 a la 12.
- 5 15.- Una composición farmacéutica para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos de mama y melanomas, sus metástasis y recidivas caracterizada porque comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales de las reivindicaciones de la 9 a la 12.
- 10 16.- Uso del anticuerpo monoclonal de las reivindicaciones de la 9 a la 12 para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de tumores malignos de mama y melanomas, sus metástasis y recidivas.

Figura 1

5

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
10	VH P3	Q	V	Q	L	K	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S
		CAG	GTG	CAG	CTG	AAG	GAG	TCA	GGA	OCT	GGC	CTG	GTG	GCA	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	TCC	ATC	ACA	TGC	ACT	GTC	TCT
		<hr/>																								
		CDR1 <hr/>																								
15		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	VH P3	G	F	S	L	S	R	Y	B	V	H			W	V	R	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	L
		GGG	TTC	TCA	TTA	TCC	AGA	TAT	AGT	GTA	CAC			TGG	GTT	CGC	CAG	OCT	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG
		<hr/>																								
		CDR2 <hr/>																								
20		49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	VH P3	G	M	I	N				G	G	G	S	T	D	Y	N	B	A	L	K	S	R	L	S	I	S
		GGA	ATG	ATA	TGG				GGT	GGT	AGC	ACA	ACC	GAC	TAT	AAT	TCA	GCT	CTC	AAA	TCC	AGA	CTG	AGC	ATC	AGC
		<hr/>																								
25	.	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c'	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
	VH P3	R	D	N	S	K	S	Q	V	F	L	K	M	N	S	L	Q	T	D	D	T	A	M	Y	Y	C
		AAG	GAC	AAC	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTC	TTA	AAA	ATG	AAC	AGT	CTG	CAC	ACT	GAT	GAC	ACA	GCC	ATG	TAC	TAC	TGT
		<hr/>																								
		CDR3 <hr/>																								
30		93	94	95	96	97	98	99	100	100a	b	c	d	e	f	g	101	102		103	104	105	106	107	108	109
	VH P3	A	R	S	G	V	R	B	G	R	A	Q	A	W	F	A	Y			W	G	Q	G	T	L	V
		GCC	AGA	AGT	GGG	GTA	CGA	GAG	GGA	AGG	GCC	CAG	GCC	TGG	TTT	GCT	TAC			TGG						

35

Figura 2

40

45	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Vkp3	D	I	V	M	T	Q	S	H	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A
	GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CAC	AAA	TTC	ATG	TCC	ACA	TCA	GTA	GGA	GAC	AGG	GTC	AGC	ATC	ACC	TGC	AAG	GCC
	CDR1																								
50	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Vkp3	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	S	T
	AGT	CAG	GAT	GTG	AGT	ACT	GCT	GTA	GCC	TGG	TAT	CAA	CAG	AAA	CCA	GGA	CAA	TCT	CCT	AAA	CTA	CTG	ATT	TGC	GCC
	CDR2																								
55	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Vkp3	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	P	T	G	S	G	S	G	T	D	P	T	P	T	I
	GCA	TCC	TAC	CGG	TAC	ACT	GGA	GTC	CCT	GAT	CGC	TTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACG	GAT	TTC	ACT	TTC	ACC	ATC
	CDR3																								
60	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Vkp3	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	H	Y	S	T	P	W	T	F	G	G
	AGC	AGT	GTG	CAG	GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	TAC	TGT	CAG	CAA	CAT	TAT	AGT	ACT	CCG	TGG	ACG	TTC	GGT	GGA
65	101	102	103	104																					
Vkp3	G	T	K	L																					
	GGC	ACC	AAG	CTG																					

Figura 3

```

5          10          20          30          40          50
VHP3  QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL SRYSVENVRQPPGKGLEWLGMI-WCGGSTDY
      X::: :::: :::: ::::: ..:::..... :::::.....: . . . v^
huhoVH QVELVESGGGVVZPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMHWVRQPPGKGLEWVAVISYBGBBKRY
          10          20          30          40          50          60

10      60          70          80          90          100         110
VHP3  NSALKSLRSISKDNKSKQVFLKMSLQTDDTAMYICARSGVREGRAQAWFAYWG-GTLV
      .....: ..:::.....:.....: : .: : :::: ::::
huhoVH ABSVKGRFTISRDBSKBTLYLQMSLRAEBTAVVYCYCARDRPLYGBYRA-FNYWQGQTLV

15      70          80          90          100         110

```

Figura 4

```

20          10          20          30          40          50          60
VKP3  DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCRASQDVSTAVAWYQOKPGQSPQLLIYSASVRYTGVPD
      :: :::: . .:::.....: : :X:.....: ::
huhovK DIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDI-TNYNWFQQRPGQAPKVLIIYGASILETGVT
25          10          20          30          40          50

          70          80          90          100
VKP3  RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSITPTFTGGTKL
      :::.....: :.....: . : :::::X.
30  huhovK RFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQYDTLPLTFTGGGTKV
          60          70          80          90          100

```

Figura 5

5

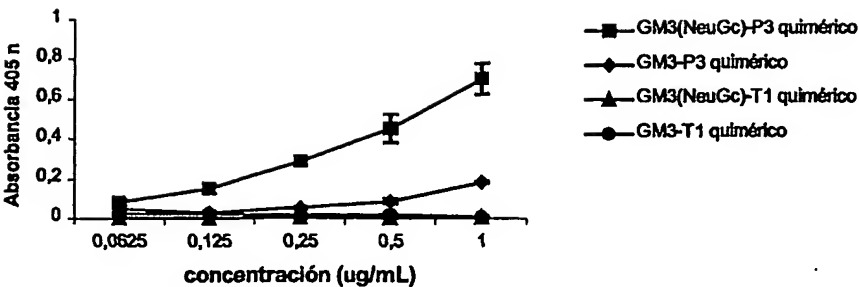


Figura 6

10

15		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25				
	VH 1E10	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S				
		CAG	GTT	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	GCT	GAA	CTG	GTA	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG	AAG	TTG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT				
20																														
		CDR1																												
	VH 1E10	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48				
		G	Y	T	F	T	S	Y	D	I	N			W	V	R	Q	R	P	E	Q	G	L	E	W	I				
		GGC	TAC	ACC	TTC	ACA	AGC	TAT	GAT	ATA	AAC			TGG	GTG	AGG	CAG	AGG	OCT	GAA	CAG	GGA	CTT	GAG	TGG	ATT				
25																														
		CDR2																												
	VH 1E10	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70				
		G	W	I	F	P			G	D	G	S	T	K	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T				
		GGA	TGG	ATT	TTT	CCT			GGA	GAT	GGT	AGT	ACT	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAG	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT				
30																														
	VH 1E10	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92				
		T	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	R	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C				
		ACA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGG	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCT	GTC	TAT	TTC	TGT				
35																														
		CDR3																												
	VH 1E10	93	94	95				96	97	98	99	100	100a	b	c	d	101	102	103				104	105	106	107	108	109	110	111
		A	R	W				D	Y	Y	D	W	S	Y	Y	F	D	Y	W				G	Q	G	T	T	L	T	V
		GCA	AGA	GAA				GAC	TAC	TAT	GAT	AAC	TCC	TAC	TAC	TTT	GAC	TAC	TGG				GGC	CAG	GGC	ACC	ACT	CTC	ACA	GTC
40																														

Figura 7

5

10	Vk1E10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
		D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	S	C	R	A
		GAT	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	ACT	ACA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCC	TCT	CTG	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	AGT	TGC	AGG	GCA
15	Vk1E10	CDR1																								
		26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
		S	Q								D	I	S	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	D	G	T
20	Vk1E10	AGT	CAG	GAC	ATT	AGC	AAT	TAT	TTA	AAC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GAT	GGA	ACT	GTT
		CDR2																								
		45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
25	Vk1E10	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T
		AAA	CTC	CTG	ATC	TAC	TAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAC	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGA	ACA
		CDR3																								
30	Vk1E10	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
		D	Y	S	L	T	I	S	N	L	E	Q	S	D	I	A	T	Y	F	C	Q	Q	G	N	T	L
		GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATT	AGC	AAC	CTG	GAG	CAA	GAA	GAT	ATT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	AAT	ACG	CTT
30	Vk1E10	CDR3																								
		95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107										
		P			W	T	P	G	G	G	T	K	L	E	S	R										
30	Vk1E10	CCG			TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA										

Figura 8

35

		10	20	30	40	50	60
	VH1E10	QVQLQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYDINWVRQRPEQGLEWIGWITPPGDGSTRY					
		..X:
	huhoVH	QTQLVQSGAEVRKPGASVRVSKASGITFIDSYIHWRQAPGHGLEWVGWINPNSGGPNY					
40		10	20	30	40	50	60
		70	80	90	100	110	
	VH1E10	NEKPKGKATLTTDKSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARED-----YY--DNSYFDYWGO					
	
45	huhoVH	APRFQGRVTMTDRDASFSTAYMDLRLSLRSDSAVFYCAKSDPFWSDYINFDYSYTLDVWGO					
		70	80	90	100	110	120
	VH1E10	CTTLTV					
50						
	huhoVH	GTTVTV					

Figura 9

```

5          10          20          30          40          50
VK1E10 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVP
          .....X.....
huhoVK DIQMTZSPSSLSASVGBRVITCRASZTISSYLEWYZZKPGKAPBLLIYAASBLHSGVP
          10          20          30          40          50

10          60          70          80          90          100
VK1E10 SRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQGNTLPTTFGGGKLESK
          .....X :
huhoVK SRFSGSGSGTBTFTTISSLZPZBFATYYCZSYSSPTTFGZGTRLZIK
15          60          70          80          90          100

```

Figura 10

